

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 826 370 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
04.03.1998 Patentblatt 1998/10(51) Int. Cl.⁶: A61K 31/41

(21) Anmeldenummer: 97104503.4

(22) Anmeldetag: 17.03.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR JE IT LI LU MC
NL PT SE

(30) Priorität: 27.08.1996 JP 225512/96

(71) Anmelder:

A. Nattermann & Cie. GmbH
D-50829 Köln (DE)

(72) Erfinder:

• Maruyama, Ikuro
Kagoshima-shi, Kagoshima (JP)

• Abeyama, Kazuhiro

Kagoshima-shi, Kagoshima (JP)

• Masayasu, Hiroyuko,

c/o Tokyo res. & dev. cent.

Edogawa-ku, Tokyo (JP)

(74) Vertreter:

Döring, Wolfgang, Dr.-Ing.

Patentanwälte

Hauck, Graafs, Wehnert, Döring, Siemens

Mörckestrasse 18

40474 Düsseldorf (DE)

(54) **Pharmazeutische Zubereitung, die 2-Phenyl-1,2-Benzisoxelenazol-3(2H)-one enthält, für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung und/oder zur Heilung der Alzheimer-Erkrankung. Die pharmazeutische Zubereitung enthält als Wirkstoff 2-Phenyl-1,2-Benzisoxelenazol-3(2H)-one (bezeichnet als Verbindung A), dessen Wirksamkeit in der Verringerung der durch β -Amyloid-Protein induzierten Neuronentoxizität begründet ist.

EP 0 826 370 A1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine präventive und/oder therapeutische pharmazeutische Zubereitung für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit, die als Wirkstoff ein 2-Phenyl-1,2-Benzisoxelenazol-3(2H)-one enthält, wobei dieser Wirkstoff die Neurotoxizität, die durch das β -Amyloid-Protein induziert wird, verringert.

In einigen Ländern werden Acetylcholinesterase-Inhibitoren, so zum Beispiel Physostigmin oder Tetrahydroaminoakridin (THA), als vorbeugende und/oder therapeutische Arzneimittel für die Alzheimer-Krankheit verwendet. Dabei konnten jedoch keine Erfolge verzeichnet werden. Ebenso wurde der Versuch unternommen, 5-HT-Antagonisten, die auf das Nervensystem wirken, zu entwickeln, jedoch ist deren Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die pathologischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit umfassen senile Plaques und eine Anhäufung von PHFs (gepaarte schraubenförmige Fasern) im Gehirn.

Das β -Amyloid-Protein, das nachfolgend auch mit A β bezeichnet ist und das den Hauptbestandteil der senilen Plaques darstellt, ist ein unlösliches Peptid, bestehend aus etwa 40 Aminosäuren-Resten. Es wurde festgestellt, daß das A β seinerseits Neuronen biochemisch schädigt und daß insbesondere geronnenes, nicht gelöstes A β diesen Effekt hervorruft.

Somit war die Entwicklung einer Substanz erwünscht, die dem Fortschreiten der senilen Demenz vom Alzheimer-Typ vorbeugt und/oder sie heilt, wobei diese Substanz aus einer pharmazeutischen Zubereitung besteht, die das durch toxisches A β herbeigeführte Absterben von Neuronen unterdrückt.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung führten zwei weitreichende Studien zur Entwicklung niedermolekularer Verbindungen durch, die imstande sind, die Blutflußgrenze des Gehirns zu überwinden und die die Neurotoxizität des A β zu reduzieren. Hierbei wurde überraschend festgestellt, daß das 2-Phenyl-1,2-Benzisoxelenazol-3(2H)-one (im folgenden auch kurz als Verbindung A bezeichnet) eine hervorragende, die vorliegende Erfindung vervollständigende Wirkung aufweist.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendete Verbindung A hemmt das durch die Anwesenheit von A β begründete Absterben von Neuronen. Somit ist die erfindungsgemäße Verwendung der Verbindung A als vorbeugende und/oder therapeutische pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit geeignet.

A β wurde als Hauptbestandteil des senilen Plaques, einem pathologischen Merkmal der Alzheimer-Krankheit, identifiziert. Es besteht aus 39-40 Aminosäure-Resten. Desweiteren ist bekannt, daß das A β neurotoxisch wirkt und somit den Zelltod hervorruft. Erst kürzlich wurde herausgefunden, daß das durch das neurotoxische A β induzierte Absterben von PC12-Zellen in Gegenwart von A β unterdrückt wird, wenn die Verbindung A (Ebselen) hinzugefügt wird. Von daher ist zu erwarten, daß die Verbindung A eine hervorragende vorbeugende und/oder therapeutische pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit darstellt.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendete Verbindung A kann durch ein in der japanischen Patentschrift (kokoku) Nr. 2-38591 (japanische Offenlegung (kokai) Nr. 57-67568) offenbartes Verfahren synthetisiert werden.

Die Verbindung A kann in verschiedenen Formen, wie z. B. als Tablette, Kapsel, Puder, Granulat, Sirup und Injektion, durch Anwendung bekannter Herstellungstechniken unter Verwendung von Zusatzstoffen, Trägern, Bindemitteln, Sprengmitteln und Lösungsmitteln dargereicht werden.

Die folgende Tabelle gibt beispielsweise die Zusammensetzung einer Tablette wieder:

Verbindung A	50 mg
Carboxymethylcellulose	25 mg
Stärke	5 mg
kristalline Cellulose	40 mg
Magnesiumstearat	2 mg
Gesamt	122 mg

Die Verbindung A behält ihre primär beanspruchte Wirkung bei jeder Art der Darreichung, so z. B. bei der üblichen oralen Anwendung oder bei der peroralen Anwendung, beispielsweise bei einer Injektion.

Im Falle der oralen Anwendung liegt die Dosis der Verbindung A für einen Erwachsenen zwischen 100 und 2.000 mg/Tag, vorzugsweise zwischen 200 und 1.000 mg/Tag, wobei diese Dosis abhängig von der klinischen Situation des Patienten entsprechend erhöht oder verringert werden kann.

Bei der Überprüfung der Toxizität der Verbindung A wurden LD₅₀-Werte bei Mäusen und Ratten ermittelt. Gemäß den Versuchen der Erfinder lagen die bei den Mäusen ermittelten LD₅₀-Werte bei ≥ 6.810 mg/kg bei oraler Anwendung und bei 740 mg/kg bei intraperitonealer Anwendung. Die bei Ratten festgestellten LD₅₀-Werte lagen bei ≥ 6.810 mg/kg.

bei oraler Anwendung und bei 580 mg/kg bei intraperitonealer Anwendung. Diese LD₅₀-Werte beweisen, daß somit die Verbindung A sehr sicher ist.

Selbst dann, wenn eine hohe Dosis der Verbindung A den Mäusen oder Ratten verabreicht wurde, konnten keine problematischen Nebeneffekte beobachtet werden.

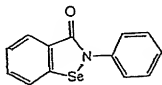
Die vorliegende Erfindung wird nunmehr anhand von Beispielen näher beschrieben, wobei diese Beispiele die vorliegende Erfindung nicht eingrenzen.

Beispiel 1

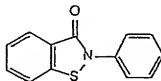
- 10 Wirkung der Verbindung A als Inhibitor des durch A β induzierten Neuronenabsterbens in Anwesenheit von A β :

Kultivierte PC12-Zellen (die von Ratten abstammen, Chromaffiner Tumor) wurden in einer 100 mm Schale (von Corning hergestellt) unterkultiviert, die mit Polylysin überzogen ist und die ein DMEM-Medium enthält, welches mit 10 % FCS and 5 % Pferdeserum (Produkt von Sigma) versetzt ist. Mit anderen Worten, die PC12-Zellen (1 x 10⁶ Zellen/Schale) wurden in einer mit Polylysin beschichteten 100 mm Schale angezüchtet. Um Unterschiede der PC12-Zellen aufzuzeigen, wuchsen die PC12-Zellen sieben Tage lang in einem DMEM-Medium, das 5 % FCS, 50 ng/ml NGF und 1 % Pferdeserum enthielt, heran. Die PC12-Zellen wurden dann durch Pipettierung abgesichert und in einem geeigneten Medium suspendiert, um so eine Zellsuspension zu erstellen. Die Zellsuspension wurde in jede Vertiefung einer mit Polylysin beschichteten Schale mit 96 Vertiefungen (1 x 10⁴ Zellen/Vertiefung) eingebracht. Hiernach wurde das A β (Bachem Feinchemikalien AG) hinzugefügt, so daß eine Endkonzentration von 10 μ M erreicht wurde. Die Verbindung A wurde nun ebenfalls hinzugefügt, so daß eine Endkonzentration von 0,1, 1,0 oder 2,5 μ M erreicht wurde. Als Kontrollsubstanz wurde eine Verbindung B (Verbindung A substituiert mit Schwefel; keine glutathione-peroxidase-ähnliche Wirkung; 2-Phenyl-1,2-Benzothiazol-3(2H)-one; durch Nattermann zur Verfügung gestellt) in der gleichen Konzentration und auf die gleiche Weise hinzugefügt. Die Zellen wurden für 48 Stunden nach Hinzufügen der Verbindung A oder der Verbindung B kultiviert.

Ein MTT-Reagens (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid) wurde den so behandelten Zellen zugesetzt. Die Inkubation wurde für 4 Stunden ausgeführt und die Zellen wurden lysiert. Die nachfolgende Verarbeitung wurde unter Anwendung des sogenannten MTT-Verfahrens durchgeführt, das kolorimetrisch auf der Basis einer Reduktionsreaktion des Reagens arbeitet, um dadurch die Lebensfähigkeit der Zellen in der Suspension (Behl, C. et al., Cell, 77: 817-827, 1994) zu ermitteln.



Verbindung A



Verbindung B

Tabelle 1:

Wirkung der Verbindungen A und B auf das Absterben von Zellen von PC12-Neuronen

hinzugefügte Substanzen (μM)	Lebensfähigkeit der Zellen	T-Test
Verbindung A	Verbindung B	(Student)

1h. 10				
10	-	-	15 \pm 9,5	-
10	0,1	-	45 \pm 2,1	*
10	-	0,1	14 \pm 4,5	
10	1,0	-	59 \pm 14,5	**
10	-	1,0	13 \pm 1,0	
10	2,5	-	66 \pm 4,5	***
10	-	2,5	10 \pm 5,0	

*: $P \leq 0,01$, **: $P \leq 0,002$, *** $P \leq 0,0001$, $n=6$

Der T-Test wurde an den Gruppen durchgeführt, denen das A β (10 μM) zugesetzt wurde.

Wie der Tabelle 1 eindeutig zu entnehmen ist, wurde das Absterben der Neuronen von dem A β verursacht, wobei die Absterberate durch das Hinzufügen der Verbindung B nicht unterdrückt werden konnte. Wenn jedoch die Verbindung A in einer Menge von 0,1 μM , 1 μM oder 2,5 μM hinzugefügt wurde, konnte in allen Fällen das Neuronenabsterben signifikant unterdrückt werden ($P \leq 0,0082$, $P \leq 0,0018$ und $P \leq 0,0001$).

Beispiel 2

Kultivierte PC12-Zellen (die von Ratten abstammen, Chromaffiner Tumor) wurden in einer 100 mm Schale (von Corning hergestellt) unterkultiviert, die mit Polylysin beschichtet ist und die ein DMEM-Medium enthält, welches mit 10 % FCS und 5 % Pferdeserum (Produkt von Sigma) versetzt ist. Mit anderen Worten, die PC12-Zellen (1×10^6 Zellen/Schale) wurden in einer mit Polylysin beschichteten 100 mm Schale angezüchtet. Um Unterschiede der PC12-Zel-

len aufzuzeigen, wuchsen die PC12-Zellen sieben Tage lang in einem DMEM-Medium, das 5 % FCS, 50 ng/ml NGF und 1 % Pferdeserum enthält, heran. Die PC12-Zellen wurden dann durch Pipettierung abgesichert und in einem geeigneten Medium suspendiert, um so eine Zellsuspension zu erstellen. Die Zellsuspension wurde in jede Vertiefung einer mit Polylysin überzogenen 60 mm Schale mit 96 Vertiefungen (1×10^4 Zellen/Vertiefung) gebettet. Nachdem die Adhäsion der Zellen bestätigt war, wurde das folgende Verfahren durchgeführt.

Die so anhaftenden PC12-Zellen wurden in einem DMEM-Medium angeordnet. $10 \mu\text{M}$ SNAP und $2,5 \mu\text{M}$ der Verbindung A wurden den Zellen zugesetzt. Bei einer Kontrollgruppe wurde nur SNAP hinzugefügt. Jede Probe wurde für 3 Stunden inkubiert. Hiernach wurde jede PC12-enhaltende Probe mit einer vorbereiteten DCFH-DA-Lösung (Molecular Probes, Inc.) in DMSO ($1 \text{ mg}/413 \mu\text{l}$) versetzt, so daß eine Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ erzielt wurde. Die Proben wurden dann für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden unter Verwendung von Trypsin-EDTA entfernt und durch Zentrifugieren ($1.000 \text{ rpm} \times 5 \text{ min.}$) wiedergewonnen. Die wiedergewonnenen Zellen wurden in $50 \mu\text{l}$ PBS(-) suspendiert, wobei sie mit Eis gekühlt wurden. Die Menge intrazellulären Wasserstoffperoxids wurde mit einem Durchflußzytometer bestimmt. Die Zellsuspension wurde einer FACS (Fluorescence-activated cell sorting) unterworfen und die Menge der durch Peroxide oxidierten, fluoreszierenden Substanz, 2',7'-Dichlorfluorescein (DCFH) wurde gemessen. Als Ergebnis wurde festgestellt, daß im Fall des Zusatzes von SNAP die Entstehung von Wasserstoffperoxid 1,3 - 1,4 mal höher war, als in dem Fall, in dem kein SNAP hinzugefügt wurde. Desweiteren wurde die durch den Zusatz von SNAP erhöhte Entstehung von Wasserstoffperoxid deutlich durch einen Zusatz von $2,5 \mu\text{M}$ der Verbindung A ($P \leq 0,0015$) unterdrückt.

Tabelle 2

Wirkung der Verbindung A auf die unterdrückte Entstehung von Wasserstoffperoxid hervorgerufen durch NO (in den PC12-Zellen, die mit SNAP versetzt wurden)		
behandelt mit		Mengen der erzeugten H_2O_2 (% log Fluoreszenz der Kontrolle) (*)
SNAP (μM)	Verbindung B (μM)	
0	0	100,0
10	0	$135,8 \pm 5,25$
10	2,5	$45,7 \pm 6,03$

SNAP: S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillinamin
 **: $P \leq 0,0015$ [in Übereinstimmung mit dem Student T-Test in bezug auf SNAP ($10 \mu\text{M}$); $n=3$]

Es ist berücksichtigt, daß das von dem A β abstammende NO die Entstehung von Wasserstoffperoxid beschleunigt. Wie jedoch die Tabelle 2 entnehmen werden kann, wurde die Entstehung von Wasserstoffperoxid zufriedenstellend durch den Zusatz von $2,5 \mu\text{M}$ der Verbindung A unterdrückt.

Kürzlich wurde hervorgehoben, daß bei der Alzheimer-Krankheit die Apoptosis mit dem Neuronenabsterben in Zusammenhang stehen kann. Desweiteren wurde berichtet, daß das Neuronenabsterben durch das A β hervorgerufen wird und daß die Neurotoxizität durch die Entstehung von Wasserstoffperoxid verursacht wird (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90:7951-7955, 1993).

Wie vorstehend beschrieben, wird die durch das A β induzierte Entstehung von Wasserstoffperoxid deutlich durch den Zusatz der Verbindung A unterdrückt. Daher konnte aufgezeigt werden, daß die Verbindung A exzellente präventive oder therapeutische Wirkungen auf die Alzheimer-Krankheit besitzt. Die in der vorliegenden Erfindung verwendete Verbindung A stellt somit eine besonders nützliche präventive oder therapeutische Zubereitung für senile Dementia, insbesondere für die Alzheimer-Krankheit, dar.

Die in der vorliegenden Anmeldung verwendeten Abkürzungen bedeuten folgendes:

Polylysin ist ein Lysin-Polypeptid mit variabler Kettenlänge;

DMEM bedeutet Delbecco's modified Eagle's medium;

DCFH ist 2',7'-Dichlorfluorescein;

FCS bedeutet fetal calf serum;

DMSO ist Dimethylsulfoxid;

Trypsin EDTA ist ein Komplexbildner auf der Basis von Äthylendiamintetraessigsäure und

NO ist Stickoxid.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit eine pharmazeutische Zubereitung zur Behandlung und/oder zur Heilung der Alzheimer-Erkrankung. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitung enthält als Wirkstoff 2-Phenyl-1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one (bezeichnet als Verbindung A), dessen Wirksamkeit in der Verringerung der durch β -Amyloid-Protein induzierten Neuronentoxizität begründet ist.

Patentansprüche

1. Verwendung von 2-Phenyl-1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Demenz.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Prophylaxe und/oder Therapie von seniler Demenz.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Demenz des Alzheimer-Types.
4. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß die Zubereitung als Wirkstoff ein 2-Phenyl-1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one als Wirkstoff enthält und daß die pharmazeutische Zubereitung zur Prophylaxe und/oder Therapie der Alzheimer-Krankheit anwendbar ist.
5. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die pharmazeutische Zubereitung als Tablette, Kapsel, Puder, Granulat, Sirup und/oder als Injektion anwendbar ist.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 10 4503

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (InCL6)
X	DAWSON ET AL: "the neuroprotective efficacy of ebselen on brain damage..." NEUROSCIENCE LETTERS, Bd. 185, Nr. 1, 1995, Seiten 65-69, XP002040434	1,4,5	A61K31/41
Y	* das ganze Dokument *	2,3	
X	KNOLLEMA ET AL: "ebsele (pz-51) protects the caudate putamen against hypoxia/ischemia induced neuronal damage" NEUROSCIENCE RES. COM., Bd. 19, Nr. 1, Juli 1996 - August 1996, Seiten 47-56, XP002040435	1,4,5	
Y	* das ganze Dokument *	2,3	
X	WD 92 02221 A (RHONE-POULENC RORER GMBH) * Seite 13 *	4,5	
Y	STOHS: "the role of free radicals in toxicity and disease" J OF BASIC AND CLIN. PHYS. AND PHARM., Bd. 6, Nr. 3-4, 1995, Seiten 205-228, XP002040436 * Seite 218, Absatz 4 - Seite 219, Absatz 1 *	2,3	

Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 30. Oktober 1997	Prüfer Trifilieff-Riolo, S	
KATEGORIE DER GENANNTE DOKUMENTE		T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentschriftstück, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur	

EP0 FORM 1502 03.82 (PAC02)